不同氮能比饲粮对妊娠环江香猪脐带血管发育相关基因表达的影响

祝　倩[1]　马思聪[1]　姬玉娇[1]　印遇龙[1]　孔祥峰[1,2*]

（1.中国科学院亚热带农业生态研究所，亚热带农业生态过程重点实验室，湖南省畜禽健康养殖工程技术研究中心，农业部中南动物营养与饲料科学观测实验站，长沙 410125；2.中国科学院环江喀斯特农业生态实验站，香猪研究中心，环江 547100）

摘　要：本试验旨在研究不同氮能比饲粮对妊娠环江香猪脐带血管发育相关基因表达的影响。选用首次妊娠的环江香猪 48 头，根据体重随机分为 2 组，每组 8 个重复（栏），每个重复 3 头猪。配种后分别饲喂高氮能比饲粮[消化能（DE）为 14.73 MJ/kg，粗蛋白质（CP）含量为 13.11%，氮能比为 0.89]和低氮能比饲粮（DE为 12.24 MJ/kg，CP含量为 9.77%，氮能比为 0.80）。分别于妊娠第 45、75 和 110 天每栏取 1 头母猪，处死屠宰，收集每窝中最大体重、平均体重和最小体重胎猪对应的脐带，利用实时荧光定量PCR方法检测血管发育相关基因——成纤维细胞生长因子（*FGF*）、血管内皮生长因子（*VEGF*）、血管内皮生长因子受体 2（*VEGFR*2）和内皮型一氧化氮合酶（*eNOS*）的表达量。结果表明：与低氮能比饲粮组相比，高氮能比饲粮显著上调了脐带血管发育相关基因的表达量（$P<0.05$），包括妊娠 45 d最大体重胎猪的*VEGF*和*VEGFR*2 表达量，平均体重胎猪的*VEGF*表达量；妊娠 75 d最大体重胎猪的*VEGF*、*VEGFR*2 和*eNOS*表达量，平均体重胎猪的*VEGF*和*eNOS*表达量，最小体重胎猪的*VEGFR*2 表达量；妊娠 110 d最大体重胎猪的*FGF*、*VEGFR*2 和*eNOS*表达量，平均体重胎猪的*FGF*和*VEGFR*2 表达量，最小体重胎猪的*VEGF*和*eNOS*表达量。不同妊娠期相同标准体重、同一妊娠期不同标准体重胎猪的脐带血管发育相关基因的表达量均存在差异。由此可见，高氮能比饲粮可能由于其蛋白质和氨基酸水平较高而显著上调了妊娠环江香猪脐带血管发育相关基因的表达量，不同妊娠期或同一妊娠期不同标准体重胎猪的脐带血管发育相关基因的表达量也存在差异。

关键词：环江香猪；妊娠；饲粮氮能比；脐带；血管发育

中图分类号：S828

在规模化养猪生产中，遗传、营养、环境和疾病等因素均可导致胎儿的死亡，且营养因素是其中非常重要的影响因素之一[1]。母体营养可通过调控母--胎界面的结构和胎盘的功

收稿日期：2016-08-01

基金项目：国家自然科学基金面上项目（31270044，31572421）；中科院“西部之光”人才培养计划重点项目

作者简介：祝　倩（1992-），女，河南周口人，硕士研究生，动物营养与饲料科学专业。E-mail: walanzhuqian@163.com

*通信作者：孔祥峰，研究员，博士生导师，E-mail: nnkxf@isa.ac.cn

能，影响胎儿的生长发育[2]。胎盘是连接母体和胎儿的器官[3]，母体通过胎盘血管与胎儿进行营养物质的交换，胎盘运输营养物质的能力与其血管的密度、通透性及大小密切相关[4]，充足的营养和丰富的血液循环是胎儿健康生长发育的前提。胎盘血管新生受阻与低初生重胎儿的发生密切相关[5]。低初生重可降低新生动物成活率，对后代的生长发育和繁殖性能等存在长期的负面影响，给畜牧业带来巨大损失。所以，研究胎盘血管的发育机制对提高母猪胎儿存活率、促进胎儿的生长发育具有重要意义。现有研究表明，妊娠期母体蛋白质和能量摄入不足及蛋白质–能量严重不平衡均可阻滞胎儿的生长发育，导致低初生重胎儿的发生[6]。营养调控是改善低初生重新生仔猪器官发育以及提高其出生后生长速度的重要手段[7]。例如，母猪饲粮中添加精氨酸可刺激胎盘一氧化氮（NO）的生成，有效缓解低初生重胎儿的发生[8]；饲粮中添加甘油三丁酸酯可改善低初生重仔猪的代谢效率，改善哺乳期低初生重仔猪的生长发育[9]；饲粮中添加亮氨酸可减少低初生重仔猪的肌肉萎缩[10]。营养素对机体生长发育的影响归根结底是调控相关基因表达的结果[11]。笔者前期研究发现，不同氮能比饲粮虽然对不同妊娠期环江香猪的胎儿数、窝重、胎儿个体重及母体成分无显著影响，但高氮能比饲粮可在一定程度上改善机体代谢，促进母体的生长发育[12]。高氮能比饲粮是否影响胎盘及脐带血管相关基因的表达尚不清楚。环江香猪是广西优良的地方猪品种之一，其饲养管理较为粗放，饲粮以青饲料为主，饲粮的营养成分不够全面，导致猪只生长缓慢[13]。因此，改善饲粮组成、促进母猪胎盘血管发育，是提高环江香猪产仔数和成活率的前提，同时对预防低初生重胎儿的发生具有重要参考价值。本试验以低氮能比饲粮为对照，研究高氮能比饲粮对妊娠环江香猪脐带血管发育相关基因表达的影响，并比较不同标准体重胎猪脐带中上述基因表达的差异，为低初生重胎儿的防治提供依据。

1　材料与方法

1.1　试验动物、分组和饲养管理

试验选用初次妊娠的环江香猪 48 头，根据体重随机分为 2 组，每组 8 个重复（栏），每个重复 3 头猪。配种后称量每头母猪的空腹体重，分别饲喂高氮能比饲粮[消化能（DE）为 14.73 MJ/kg，粗蛋白质（CP）含量为 13.11%，氮能比为 0.89]和低氮能比饲粮（DE为 12.24 MJ/kg，CP含量为 9.77%，氮能比为 0.80）。高氮能比饲粮参照NRC（1998）饲养标准对能量、蛋白质和粗纤维的推荐需要量配制，为高能、高蛋白质、低纤维饲粮；低氮能比饲粮参照中国地方猪对能量、蛋白质和粗纤维需要量的饲养标准配制，为低能、低蛋白质、高纤维饲粮。试验饲粮组成及营养水平见表 1。2 种试验饲粮的氮能比分别为 0.89 和 0.80，其中使用的 1%预混料相同，均参照NRC（1998）饲养标准的推荐需要量。整个试验期间，每日每

栏母猪的总采食量为 3 头母猪总体重的 2.5%。每日 08:30 和 17:00 各饲喂 1 次，自由饮水；所有试验猪按猪场饲养管理计划进行常规免疫和管理。

表1 试验饲粮组成及营养水平（风干基础）

Table 1 Composition and nutrient levels of experimental diets (air-dry basis) %

原料 Ingredients	高氮能比饲粮 High nitrogen/energy diet	低氮能比饲粮 Low nitrogen/energy diet	营养水平 Nutrient levels[2)]	高氮能比饲粮 High nitrogen/energy diet	低氮能比饲粮 Low nitrogen/energy diet
玉米 Corn	58.20	57.20	粗蛋白质 CP	13.11	9.77
豆粕 Soybean meal	11.00		消化能 DE/(MJ/kg)	14.73	12.24
麦麸 Wheat bran	11.50	11.00	粗纤维 CF	4.56	6.86
米糠 Rice bran	4.00	13.00	粗脂肪 EE	9.34	5.00
苜蓿草粉 Alfalfa meal	3.00	14.00	赖氨酸 Lys	1.11	0.83
豆油 Soybean oil	7.50		蛋氨酸+半胱氨酸 Met+Cys	0.65	0.52
磷酸氢钙 $CaHPO_4$	1.15	1.15	苏氨酸 Thr	0.65	0.50
石粉 Limestone	0.79	0.79	色氨酸 Trp	0.18	0.13
食盐 NaCl	0.30	0.30	精氨酸 Arg	0.58	0.27
赖氨酸 Lys	0.88	0.88	组氨酸 His	0.27	0.15
蛋氨酸 Met	0.27	0.27	异亮氨酸 Ile	0.36	0.18
苏氨酸 Thr	0.33	0.33	亮氨酸 Leu	0.87	0.56
色氨酸 Try	0.08	0.08	苯丙氨酸 Phe	0.45	0.24

预混料 Premix[1)]	1.00	1.00	缬氨酸 Val	0.42	0.24
合计 Total	100.00	100.00	天冬氨酸 Asp	0.96	0.52
			半胱氨酸 Cys	0.22	0.16
			谷氨酸 Glu	1.97	1.23
			甘氨酸 Gly	0.43	0.27
			脯氨酸 Pro	0.64	0.38
			钙 Ca	0.62	0.58
			总磷 TP	0.52	0.44

[1)]预混料为每千克饲粮提供 The premix provided the following per kg of diets: VA 12 040 IU，VD_3 2 112 IU，VE 29.7 IU，VK_3 2.8 mg，VB_1 1.2 mg，VB_2 7.1 mg，VB_6 1.3 mg，VB_{12} 0.03 mg，烟酸 nicotinic acid 42.9 mg，泛酸 pantothenic acid 21.6 mg，叶酸 folic acid 0.44 mg，生物素 biotin 0.12 mg，胆碱 choline 320 mg，Fe 80 mg，Cu 40 mg，Zn 140 mg，Mn 52 mg，I 0.56 mg，Co 1.4 mg，Se 0.33 mg.

[2)]粗蛋白质、粗纤维和粗脂肪为实测值，其余为计算值。CP, CF and EE were measured values, while the others were calculated values.

1.2 样品采集

根据Johnston等[14]的报道，妊娠母猪的妊娠期可分为前期（1~30 d）、中期（30~75 d）和后期（75 d~分娩）。但由于环江香猪为小型猪品种，为了便于分析妊娠早期孕体的生长发育，本试验分别于妊娠 45（前期）、75（中期）和 110 d（后期），每重复随机取 1 头母猪，每个组共取 8 头母猪，心脏放血处死后屠宰，收集每窝胎猪并称重，选取每窝中最大体重、平均体重和最小体重胎猪（每窝共取 3 头）对应的脐带，液氮速冻后–80 ℃保存，测定血管发育相关基因的表达量。

1.3 RNA提取与反转录

按试剂盒说明采用Trizol法提取脐带总RNA。利用Nanodrop 2000 分光光度计（Nano-drop Technologies,Wilmington,DE）测定RNA的浓度与纯度，吸光度（OD）$_{260/280}$ 在 1.8~2.2 之间较为理想。利用TaKaRa RR036TA反转录试剂盒进行反转录，合成第一链cDNA，置于–20 ℃保存。

1.4 基因表达量检测

采用Premier 5.0 软件设计目标基因引物序列，送上海生工生物工程股份有限公司合成。

目标基因及其引物序列如下。成纤维细胞生长因子（*FGF*）：F:5′-TCAAAGGAGTGTGTGCGAAC-3′，R:5′-CAGGGCCACATACCAACTG-3′；血管内皮生长因子（*VEGF*）：F:5′-CCTGATGCGGTGCGGGGGCT-3′，R:5′-TGGTGGTGGCGGCGGCTATG-3′；血管内皮生长因子受体 2（*VEGFR*2）：F:5′-TACGTTGGAGCAATCCCTGT-3′，R:5′-TACACTTTCGATGCCAAG-3′；内皮型一氧化氮合酶（*eNOS*）：F:5′-ATGAAGCACCTGGAGAACGA-3′，F:5′-ATGAAGCACCTGGAGAACGA-3′。按下述反应条件在ABI7 900HT型实时荧光定量（RT）-PCR仪上进行扩增，检测样品中目标基因的转录情况。PCR反应体系为 10 μL，包括：5.0 μL 2×SYBR Green PCR Master Mix，0.4 μL上、下游引物（10 μmol/L），2 μL cDNA模板，dd H_2O补齐至 10 μL。PCR反应程序为：95 ℃，30 s；95 ℃，5 s；60 ℃，30 s；40 个循环。以β-肌动蛋白（β-actin）作为内参，用Applied Biosys-tem SDS 2.3 软件进行数据分析。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$方法处理数据，待测基因的表达量计算公式为：

$$-\Delta\Delta CT=(CT_{目的基因}-CT_{内参基因})_{试验组}-(CT_{目的基因}-CT_{内参基因})_{对照组}。$$

1.5　数据处理与分析

利用SPSS 18.0 软件对同一妊娠期、同一体重、不同饲粮组间的数据进行独立样本*t*检验；同一饲粮组和标准体重、不同妊娠期，同一饲粮组和妊娠期、不同标准体重的数据进行单因素方差分析（one-way ANOVA,LSD）。数据以“平均值±标准误”表示。$P<0.05$ 表示差异显著，$0.05\leq P<0.10$ 表示有变化趋势。

2　结　果

2.1　不同氮能比饲粮对妊娠环江香猪脐带血管 *FGF* 基因表达量的影响

由表 2 可知，与低氮能比饲粮组相比，高氮能比饲粮组妊娠 110 d的最大体重、平均体重胎猪的脐带血管*FGF*基因表达量均显著升高（$P<0.05$）；高氮能比饲粮组妊娠 45 d最大体重胎猪的脐带血管*FGF*基因表达量显著高于其他 2 个标准体重组（$P<0.05$）。

表 2　不同氮能比饲粮对妊娠环江香猪脐带血管 *FGF* 基因表达量的影响

Table 2　Effects of different nitrogen/energy diets on umbilical vessel *FGF* gene expression level of pregnant *Huanjiang* mini-pigs (n=8)

妊娠时间 Pregnant time/d	高氮能比饲粮组 High nitrogen/energy diet group			低氮能比饲粮组 Low nitrogen/energy diet group		
	最大体重	平均体重	最小体重	最大体重	平均体重	最小体重

	Maximal BW	Average BW	Minimal BW	Maximal BW	Average BW	Minimal BW
45	1.45±0.14^{A}	1.00±0.06^{B}	1.02±0.02^{B}	0.58±0.19	0.58±0.06	0.95±0.04
75	1.2±0.15	1.19±0.19	1.21±0.20	0.67±0.09	0.62±0.14	0.81±0.16
110	1.47±0.58	0.84±0.10	1.02±0.19	0.54±0.08*	0.52±0.03*	0.58±0.09

数据肩标不同小写字母表示同列数据间比较差异显著（*P*<0.05），不同大写字母表示同种饲粮不同标准体重间比较差异显著（*P*<0.05），*表示不同饲粮间、相同日龄和标准体重比较差异显著（*P*<0.05）。下表同。

Values in the same column with different small letter superscripts mean significantly difference (*P*<0.05), and with different capital letter superscripts mean significantly difference in the same diet and different standard body weight (*P*<0.05), * mean significantly difference in the different diets but at the same days of age and standard body weight (*P*<0.05). The same as below.

2.2　不同氮能比饲粮对妊娠环江香猪脐带血管 *VEGF* 和 *VEGFR*2 基因表达量的影响

由表 3 可知，与低氮能比饲粮组相比，高氮能比饲粮组妊娠 45、75 d的最大体重和平均体重胎猪以及妊娠 110 d的平均体重和最小体重胎猪的脐带血管*VEGF*基因表达量显著升高（*P*<0.05），妊娠 110 d最大体重胎猪的脐带血管*VEGF*基因表达量呈升高趋势（*P*=0.087）；高氮能比饲粮组妊娠 45、75 和 110 d最大体重胎猪，妊娠 75 d最小体重胎猪和妊娠 110 d平均体重胎猪的脐带血管*VEGFR*2 基因表达量显著升高（*P*<0.05）。随着妊娠时间的延长，低氮能比饲粮组妊娠 45 d最大体重胎猪的脐带血管*VEGF*基因表达量显著高于妊娠 110 d（*P*<0.05），最小体重胎猪的脐带血管*VEGF*基因表达量显著高于妊娠 75 和 110 d（*P*<0.05）；低氮能比饲粮组最小体重胎猪的脐带血管*VEGFR*2 基因表达量先显著升高后显著降低（*P*<0.05）。低氮能比饲粮组不同体重间比较，妊娠 75 d最大体重胎猪的脐带血管*VEGFR*2 基因表达量显著低于平均体重和最小体重胎猪（*P*<0.05）。

表 3　不同氮能比饲粮对妊娠环江香猪脐带血管*VEGF*和*VEGFR*2 基因表达量的影响

Table 3　Effects of different nitrogen/energy diets on umbilical vessel *VEGF* and *VEGFR*2 gene expression level of pregnant *Huanjiang* mini-pigs (*n*=8)

基因 Genes	妊娠时间 Pregnant	高氮能比饲粮组 High nitrogen/energy diet group			低氮能比饲粮组 Low nitrogen/energy diet group		
		最大体重 Maximal	平均体重 Average	最小体重 Minimal	最大体重 Maximal BW	平均体重 Average BW	最小体重 Minimal BW

	time/d	BW	BW	BW			
血管内皮生长因子 *VEGF*	45	1.51±0.72	1.74±0.91	1.82±0.39	0.31±0.14^{*a}	0.29±0.13*	0.74±0.06^{a}
	75	1.62±0.41	1.49±0.47	0.89±0.20	0.66±0.09^{*ab}	0.48±0.09*	0.41±0.08^{b}
	110	0.71±0.15	1.40±0.94	1.73±1.00	0.09±0.06^{b}	0.18±0.02*	0.29±0.05^{*b}
血管内皮生长因子受体 2 *VEGFR*2	45	1.25±0.54	1.03±0.13	0.52±0.08	0.32±0.15*	0.45±0.09	0.56±0.03^{b}
	75	2.24±0.65	1.14±0.17	2.18±0.62	0.32±0.07^{*B}	0.68±0.12^{A}	0.91±0.11^{*aA}
	110	1.98±0.40	1.22±0.63	0.51±0.03	0.30±0.07*	0.38±0.08*	0.18±0.05^{c}

2.3　不同氮能比饲粮对妊娠环江香猪脐带血管 *eNOS* 基因表达量的影响

由表 4 可知，与低氮能比饲粮组相比，高氮能比饲粮组妊娠 75 d最大体重、平均体重胎猪和妊娠 110 d最大体重、最小体重胎猪的脐带血管*eNOS*基因表达量均显著升高（P<0.05）；妊娠 45 d最大体重（P=0.052）、平均体重（P=0.065）和最小体重胎猪（P=0.057）的脐带血管*eNOS*基因表达量有升高趋势。随妊娠期的延长，高氮能比饲粮组最大体重胎猪的脐带血管*eNOS*基因表达量呈先升高后降低的趋势（P=0.055）。

表 4　不同氮能比饲粮对妊娠环江香猪脐带血管 *eNOS* 基因表达量的影响

Table 4　Effects of different nitrogen/energy diets on umbilical vessel *eNOS* gene expression of pregnant *Huanjiang* mini-pigs (n=8)

妊娠时间 Pregnant time/d	高氮能比饲粮组 High nitrogen/energy diet group			低氮能比饲粮组 Low nitrogen/energy diet group		
	最大体重 Maximal BW	平均体重 Average BW	最小体重 Minimal BW	最大体重 Maximal BW	平均体重 Average BW	最小体重 Minimal BW
45	0.56±0.15	2.14±0.27	1.49±0.75	0.35±0.17	0.24±0.10	0.33±0.03
75	2.19±0.46	2.20±0.60	1.37±0.29	0.43±0.06*	0.30±0.11*	0.53±0.17
110	0.89±0.04	1.41±0.92	1.56±0.98	0.12±0.05*	0.40±0.28	0.20±0.15*

3　讨　论

FGF可以刺激子宫动脉和胎儿胎盘动脉内皮细胞的增殖，胚泡中碱性FGF可能对子宫内

膜的血管生成反应有放大作用，可诱导中胚层细胞分化为成血管细胞[15]。FGF也可直接作用于血管细胞，诱导血管内皮细胞生长，促进血管形成[16]。发育良好的胎盘血管密度大，运输氧气和营养物质能力较强，胎儿体重就较大[17]。本试验结果表明，高氮能比饲粮可显著上调*FGF*基因的表达量，进而影响血管发育和妊娠后期胎儿的生长发育。

VEGF作为主要的促血管生长因子，可促进血管内皮细胞的分裂和迁移，增强毛细血管的通透性[18]，调控血管生成和血管新生的进程，在血管的形成中发挥重要的作用[19]。血管发育过程中，VEGF主要通过血管内皮生长因子受体 1（VEGFR1）和VEGFR2 发挥其生物学作用，且VEGFR2 是VEGF的主要受体，可促进血管发育[20]。Chen等[21]研究表明，宫内生长迟缓(intrauterine growth retardation,IUGR)动物胎盘中*VEGF*的表达量降低。本试验结果表明，与低氮能比饲粮组相比，高氮能比饲粮组可显著上调*VEGF*和*VEGFR*2 基因的表达量，从而促进血管的发育，增加胎盘和脐带血的血流量；随着妊娠期的延长，低氮能比饲粮组妊娠 45 d体重最大体重和最小体重胎猪的脐带血管*VEGF*基因表达量最高，与前人报道的妊娠早期血管就开始发育一致[22]。一般认为，到妊娠中期胎盘血管网的发育就基本成熟。本研究中，妊娠 75 d时，低氮能比饲粮组最小体重胎猪的脐带血管*VEGFR*2 表达量最高，平均体重和最小体重胎猪的脐带血管*VEGFR*2 基因表达量均显著高于最大体重胎猪，这可能是由于妊娠中期平均体重和最小体重胎猪为了维持自身的生长发育，仍需要更多的血管生成。

eNOS对于调控血管的功能具有重要作用[23]。在生理状态下，由eNOS合成的NO具有松弛平滑肌细胞、促进血管生长等作用[24]。本试验中，高氮能比饲粮可显著上调胎猪的脐带血管*eNOS*基因的表达量，增加NO生成，进而促进血管发育。VEGF通过增加NO的量诱导血管的生成，促进血液循环[25]。NOS是血管系统NO的主要来源，且VEGF可通过激活VEGFR2增加*eNOS*的表达量[5]。本研究中，最大体重胎猪妊娠后期的脐带血管*eNOS*与*VEGF*、*VEGFR*2的表达量变化相一致，说明eNOS产生的NO可能参与了VEGF的促血管生成作用。

本研究采用的高氮能比饲粮中粗蛋白质、赖氨酸（Lys）、蛋氨酸+半胱氨酸（Met+Cys）、苏氨酸（Thr）、色氨酸（Trp）、精氨酸（Arg）、组氨酸（His）、异亮氨酸（Ile）、亮氨酸（Leu）、苯丙氨酸（Phe）、缬氨酸（Val）、天冬氨酸（Asp）、半胱氨酸（Cys）、谷氨酸（Glu）、甘氨酸（Gly）和脯氨酸（Pro）的含量比低氮能比饲粮分别高了 34.19%、33.73%、25.00%、30.00%、38.46%、114.81%、80.00%、100.00%、55.36%、87.50%、75.00%、84.62%、37.50%、60.16%、59.26%和 68.42%。高氮能比饲粮可显著上调胎猪的脐带血管*FGF*、*VEGF*、*VEGFR*2 和*eNOS*基因的表达量，这与其中含有较高含量的氨基酸有关。例如，Arg可作为合成血管发育相关因子的底物，从而有利于胎儿的血管发育。Wu等[26]研究表明，在饲粮中添

加Arg可上调胎盘血管*VEGF*和*eNOS*基因的表达量，从而改善胎盘血管的功能，促进胎儿的生长发育；刘俊峰等[8]研究发现，饲粮中添加Arg可显著促进胎盘中总一氧化氮合酶(TNOS)和原生型一氧化氮合酶(cNOS)的活性。因此，与低氮能比饲粮相比，高氮能比饲粮含有足够的功能性氨基酸以满足胎盘血管发育的需要。

4 结 论

高氮能比饲粮可显著上调妊娠环江香猪胎猪脐带血管发育相关基因的表达量，有利于胎猪脐带血管的发育，这与其中蛋白质和氨基酸含量较高有关；不同妊娠期或同一妊娠期不同标准体重胎猪的脐带血管发育相关基因的表达量存在差异，这可能与低初生重胎儿的发生有关。

参考文献：

[1] 胡建红,岳国璋,杜芳,等.营养调控对母猪繁殖性能的影响[J].畜牧兽医杂志,2011,30(6):43–44.

[2] SFERRUZZI-PERRI A N,CAMN E J.The programming power of the placenta[J].Frontiers in Physiology,2016,7:33.

[3] FISHER S J.Why is placentation abnormal in preeclampsia?[J].American Journal of Obstetrics & Gynecology,2015,213(Suppl.4):S115–S122.

[4] WU S P,XU X W,LI C C,et al.Six placenta permeability-related genes:molecular characterization and expression analysis in pigs[J].Animal,2009,3(3):408–414.

[5] BOLEHOVSAKÁ P,SEHNAL B,DRIÁK D,et al.Changes in placental angiogenesis and their correlation with foetal intrauterine restriction[J].Ceska Gynekologie,2015,80(2):144–150.

[6] 孔祥峰,伍国耀,印遇龙.猪宫内生长迟缓及其防治研究进展[J].畜牧与兽医,2009,41(10):96–101.

[7] 孔祥峰,印遇龙,伍国耀.猪功能性氨基酸营养研究进展[J].动物营养学报,2009,21(1):1–7.

[8] 刘俊锋,吴琛,孔祥峰,等.精氨酸对妊娠环江香猪胎儿生长发育的影响[J].中国农业科学,2011,44(5):1040–1045.

[9] HE J T,DONG L,XU W,et al.Dietary tributyrin supplementation attenuates insulin resistance and abnormal lipid metabolism in suckling piglets with intrauterine growth retardation[J].PLoS One,2015,10(8):e0136848.

[10] XU W,BAI K W,HE J T,et al.Leucine improves growth performance of intrauterine growth retardation piglets by modifying gene and protein expression related to protein

synthesis[J].Nutrition,2016,32(1):114–121.

[11] 石彩霞,王海荣.营养基因组学在动物营养与饲料科学研究中的应用[J].饲料研究,2014(1):13–15,22.

[12] 祝倩,姬玉娇,李华伟,等.高、低营养水平饲粮对妊娠环江香猪繁殖性能、体成分和血浆生化参数的影响[J].动物营养学报,2016,28(5):1534–1540.

[13] 张莲英,苏家联,韦朝阳,等.环江香猪和巴马香猪生产情况调查[J].养殖与饲料,2011(10):5–7.

[14] JOHNSTON L,TROTTIER N.Nutritional methods to improve sow productivity examined[J].Feedstuffs,1999,25:12–17.

[15] HALDER J B,ZHAO X,SOKER S,et al.Differential expression of VEGF isoforms and $VEGF_{164}$-specific receptor neuropilin-1 in the mouse uterus suggests a role for $VEGF_{164}$ in vascular permeability and angiogenesis during implantation[J].Genesis,2006,26(3):213–224.

[16] 许英蕾,孙建义.成纤维细胞生长因子与其受体的研究进展[J].药物生物技术,2004,11(3):194–198.

[17] 严宏祥,黄小燕,徐来仁.妊娠母猪的精氨酸营养与胎儿发育[J].饲料广角,2010(7):26–27,31.

[18] 谭兵兵,王乾兴,谭晓珊,等.胎盘绒毛血管生成状况及*VEGF*、*MMP*-2 和 *MMP*-9 表达与早期自然流产的关系[J].生殖与避孕,2006,26(8):477–482.

[19] SHIBUYA M.Vascular endothelial growth factor and its receptor system:physiological functions in angiogenesis and pathological roles in various diseases[J].Journal of Biochemistry,2013,153(1):13–19.

[20] 高成,闫小毅,卓巍,等.胚胎发育中血管新生的研究[J].中国细胞生物学学报,2015,37(5):720–727.

[21] CHEN F,WANG T J,FEGN C P,et al.Proteome differences in placenta and endometrium between normal and intrauterine growth restricted pig fetuses[J].PLoS One,2015,10(11):e0142396.

[22] DEMIR R,SEVAL Y,HUPPERTZ B.Vasculogenesis and angiogenesis in the early human placenta[J].Acta Histochemica,2007,109(4):257–265.

[23] LU Y,XIONG Y,HUO Y Q,et al.Grb-2-associated binder 1 (Gab1) regulates postnatal ischemic and VEGF-induced angiogenesis through the protein kinase A-endothelial NOS

pathway[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2011,108(7):2957–2962.

[24] 范辉,胡雅兵,王小红,等.丹红注射液对重症急性胰腺炎大鼠胰腺组织*ET*-1、*eNOS*和*iNOS*基因表达的影响[J].世界华人消化杂志,2009,17(27):2784–2790.

[25] VALDÉS G,CORTHORN J.The angiogenic and vasodilatory utero-placental network[J].Placenta,2011,32(Suppl. 2):S170–S175.

[26] WU X,YIN Y L,LIU Y Q,et al.Effect of dietary arginine and N-carbamoylglutamate supplementation on reproduction and gene expression of e*NOS*,*VEGFA* and *PlGF*1 in placenta in late pregnancy of sows[J].Animal Reproduction Science,2012,132(3/4):187–192.

Effects of Different Nitrogen/energy Diets on Expression of Genes Related to Umbilical Vessel Development of Pregnant *Huanjiang* Mini-Pigs

ZHU Qian[1] MA Sicong[1] JI Yujiao[1] YIN Yulong[1] KONG Xiangfeng[1,2*]

(1. *Key Laboratory of Agro-Ecological Processes in Subtropical Region, Hunan Provincial Engineering Research Center of Healthy Livestock, Scientific Observing and Experimental Station of Animal Nutrition and Feed Science in South-Central, Ministry of Agriculture, Institute of Subtropical Agriculture, Chinese Academy of Sciences, Changsha* 410125, *China*; 2. *Research Center of Mini-Pig, Huanjiang Observation and Research Station for Karst Ecosystems, Chinese Academy of Sciences, Huanjiang* 547100, *China*)

Abstract: This study was conducted to investigate the effects of different nitrogen/energy diets on expression of genes related to umbilical vessel development of pregnant *Huanjiang* mini-pigs. A total of 48 primiparous *Huanjiang* mini-pigs were randomly assigned into two groups according to the body weight (BW), and reared in eight replicates (pens) with three mini-pigs per replicate. After service, the animals were fed with high nitrogen/energy diet (digestible energy was 14.73 MJ/kg, crude protein content was 13.11%, nitrogen/energy was 0.89) and low nitrogen/energy diet (digestible energy was 12.24 MJ/kg, crude protein content was 9.77%, nitrogen/energy was 0.80), respectively. At 45, 75, and 110 days of gestation, one pig was randomly selected and sacrificed

*Corresponding author, professor, E-mail: nnkxf@isa.ac.cn (责任编辑 武海龙)

from each pen. The umbilical cord tissues were collected from three fetuses with maximal BW, average BW and minimal BW per litter. The expression levels of fibroblast growth factor (*FGF*), vascular endothelial growth factor (*VEGF*), vascular endothelial growth factor receptor 2 (*VEGFR*2) and endothelial nitric oxide synthase (*eNOS*), which related to umbilical vessel development, were detected by RT-qPCR technique. The results showed that compared with the low nitrogen/energy diet group, the high nitrogen/energy diet significantly increased the expression levels of genes related to umbilical vessel development (P<0.05), including *VEGF* and *VEGFR*2 genes expression levels of fetus at 45 d of gestation with maximal BW; *VEGF* gene expression level of fetus at 45 d of gestation with average BW; *VEGF*, *VEGFR*2 and *eNOS* genes expression levels of fetus at 75 d of gestation with maximal BW; *VEGF* and *eNOS* genes expression levels of fetus at 75 d of gestation with average BW, *VEGFR*2 gene expression level of fetus at 75 d of gestation with minimal BW; *FGF*, *VEGFR*2 and *eNOS* genes expression levels of fetus at 110 d of gestation with maximal BW, *FGF* and *VEGFR*2 genes expression levels of fetus at 110 d of gestation with average BW, and *VEGF* and *eNOS* genes expression levels of fetus at 110 d of gestation with minimal BW. The expression levels of umbilical vessel genes of fetuses in different gestation stages with the same standard BW were different, as well as of fetuses with different standard BW in a same gestation stage. These findings suggest that the high nitrogen/energy diet containing higher levels of protein and amino acids can significantly increase the expression levels of genes related to the umbilical vessel development in pregnant *Huanjiang* mini-pigs, and the tested gene expression levels are different during different gestation stages, as well as among the fetuses with different standard body weights during a same gestation stage.

Key words: *Huanjiang* mini-pigs; pregnancy; dietary nitrogen/energy ratio; umbilical cord; blood vessel development